

Short Report

筋芽細胞の増殖と筋線維型決定におけるストレス応答ホルモンの影響

佐藤勝祥, 綿引佑輔, 横尾正樹

秋田県立大学生物資源科学部アグリビジネス学科

本研究では、アペリン、オキシトシンおよびセロトニンの三種類のストレス応答ホルモンに着目し、産肉性と肉質への影響を検討することを目的として、肉用牛における血中ホルモン濃度動態の検討と、筋芽細胞の増殖と筋管への分化におけるストレス応答ホルモン刺激の影響を検討した。結果、肉用牛の血中アペリン濃度は成長因子の指標として用いた血中インスリン様成長因子 I (IGF-I) 濃度との間に強い正の相関が見られ、アペリンが筋肉の成長を促進する可能性が示唆された。また、血中のセロトニン濃度と血中 IGF-I 濃度の間には弱い負の相関が見られたことから、セロトニンは筋肉の成長において抑制的な作用を持つ可能性が示唆された。筋芽細胞から筋管への分化におけるストレス応答ホルモンの影響では、アペリンが I 型筋線維への分化を、セロトニンが II 型筋線維への分化をそれぞれ抑制する可能性が示唆された。この結果は今後、発現しているタンパク質を解析することで実際に分化した筋線維型を分析し、詳細を検討していく必要があると考えられる。以上の結果から、本研究で着目したストレス応答ホルモンが牛においても産肉性と肉質に影響を与える可能性が示唆され、ストレスの少ない飼育環境と、産肉性と肉質の向上に向けてこれらのホルモンを指標として用いることの可能性が示された。

キーワード：アペリン, オキシトシン, セロトニン, 筋芽細胞, C2C12 細胞

近年、輸入飼料に依存した我が国の牛肉生産は BSE 等の発生に見られる食の安全性に関する問題や、集約的な飼養形態における家畜福祉等の多くの問題を抱えている。秋田県立大学附属フィールド教育研究センター (FC) で飼育されている日本短角種牛は、粗飼料の利用効率に優れており、放牧飼育に適していることから、地元の飼料資源を有効に活用してのびのびと成育し、安全安心な食肉資源として魅力的である。また、ストレスは家畜の成長や畜産物の質に悪影響をおよぼす可能性があることから、ストレスの少ない飼育環境の構築は畜産現場において重要な課題である。筆者らは、ストレス応答ホルモンを指標としてストレスの少ない飼育環境の構築を目指しており、特に、アペリン、オキシトシンおよびセロトニンの3つのホルモンに着目して研究を行っている。アペリンは、ヤギやヒツジの水分代謝に関するストレス

反応によって分泌が促進されることが明らかとなっており、反芻動物におけるストレス応答において重要な役割を担っていることが報告されている。また、オキシトシンには母性行動や攻撃性をコントロールする働きがあり、セロトニン不足はストレス耐性の低下や睡眠障害を引き起こすことが知られている。ところで、筋肉の質 (筋線維型) は、運動負荷などの物理的な刺激によって調節されていると考えられていたが、最近の報告では内分泌ホルモンによる調節機構の存在が明らかになってきている。Elab らは老齢マウスへのオキシトシン投与によって骨格筋の再生能が回復することを報告し、渡邊らは高脂肪食由来の肥満マウスへのセロトニン投与が I 型筋線維割合を増加させることを報告している。これらの報告から、ストレス応答ホルモンが筋肉の成長と肉質へ影響を与える可能性が示唆されている。そこで、本研究ではア

ペリン, オキシトシンおよびセロトニンによる骨格筋への影響を検討することを目的とした。

材料および方法

肉用牛におけるストレス応答ホルモン濃度

ストレス応答ホルモンと産肉性の関連を検討するため, FC で飼育されている肉用牛から採血を行い, 各種ホルモン濃度の相関を検討した。FC で飼育されている日本短角種牛 9 頭と黒毛和種牛 3 頭から採血を行い, 本研究で着目しているアペリン, オキシトシンおよびセロトニンに加え, ストレスの指標としてコルチゾール濃度を, 産肉性の指標としてインスリン様成長因子 I (IGF-I) 濃度を測定した。アペリンおよびセロトニンの測定は, ユーロピウムを用いた時間分解蛍光法と 2 抗体法による競合法を利用して測定方法を確立した。他のホルモンについては市販のキット(オキシトシンおよびコルチゾール; Enzo Life Sciences, IGF-I ; R&D systems) を使用した。

マウス由来筋芽細胞 (C2C12) の分化誘導刺激におけるストレス応答ホルモン刺激の影響

理化学研究所から購入したマウス由来筋芽細胞株 (C2C12 細胞株) を用いて研究を行った。ダルベッコ変性イーグル培地 (DMEM, high-glucose) に, 牛胎児由来血清 (FBS) を 10%, 抗生物質 (ペニシリン-ストレプトマイシン) を 1% 添加して増殖用培地とした。6well プレートを用いて, 1well あたり 9×10^4 個 (1.0×10^4 個 / cm^2) 程度になるように細胞を播種し, 2 日おきに培地を交換しながら, 培養を行った。培養条件は, 37°C , 5% CO_2 , 95% 空気とした。

2% ウマ血清を加えたダルベッコ変性イーグル培地 (DMEM, low-glucose) を分化誘導培地とした。6well プレートを用いて, 細胞がウエルの 8 割程度を占めるまで培養を続けた後, 培地を分化誘導培地に変え, 分化誘導刺激を行った。細胞は 10 日程度の分化誘導刺激によって, 筋管を形成した (データ未掲載)。この時, 分化誘導培地に各種ストレス応答ホルモンを $1.0 \mu\text{M}$ の濃度で添加し, 分化誘導時におけるストレス応答ホルモンの影響を検討した。2 日おきに培地交換を行いながら 10 日間培養した後, 各ウ

ェルに RNAiso Plus (タカラバイオ) を $700 \mu\text{l}$ ずつ加えて細胞を回収した。回収した RNAiso Plus にクロロホルムを $200 \mu\text{l}$ ずつ加えて 10 秒間混和した後, 室温で 5 分間静置し, $12,000 \times G$, 4°C で 15 分間遠心分離した。その後, 上清のみを回収し, イソプロパノールを $500 \mu\text{l}$ ずつ加えて数回転倒混和した後, 室温で 10 分間静置し, $12,000 \times G$, 4°C で 10 分間遠心分離した。上清をアスピレートした後, 70% エタノールを加え, 同様にして遠心分離した。上清をアスピレートした後, 回収した RNA を RNase-free- H_2O に溶解させた。逆転写キット (PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser; タカラバイオ) を用いて cDNA を作成した後, リアルタイム PCR 法 (LightCycler® 96 System, Roche) を用いて I 型筋線維に発現する MyHC I mRNA および II 型筋線維に発現する MyHC II a, MyHC II b, MyHC II x mRNA の発現量を解析した。用いたプライマーの配列を表 1 に示す。18s rRNA を内部標準として相対定量解析を行った。

統計処理

細胞増殖率については, 培養 1 日目の細胞数を 100 として, 細胞増殖率を算出した。刺激ホルモン区ごとに統計処理を行い, t 検定を用いて対照区と有意差を検討した。また, 分化誘導における遺伝子発現解析については, 18s rRNA を内部標準として, 各 mRNA 発現量を標準化した。二元配置分散分析処理後, Turkey の多重比較検定を行った。危険率 5% 未満を有意な差と判定した。結果は, 平均値 \pm 標準誤差を示している。

表 1 プライマー配列

遺伝子	塩基配列
MyHC I	5' -CTCAAGCTGCTCAGCAATCTATTT-3' 5' -GGAGCGCAAGTTTGTCTAAGT-3'
MyHC II a	5' -AGGCGGCTGAGGAGCACGTA-3' 5' -GCGGCACAAGCAGCGTTGG-3'
MyHC II x	5' -GAGGGACAGTTCATCGATAGCAA-3' 5' -GGGCCAACTTGTCTCTCTCAT-3'
MyHC II b	5' -CACCTGGACGATGCTCTCAGA-3' 5' -GCTCTTGCTCGGCCACTCT-3'

結果と考察

肉用牛におけるストレス応答ホルモン濃度

肉用牛の各種ホルモン濃度の相関を表 2 に示す。この結果、ストレスの指標であるコルチゾール濃度と産肉生の指標である IGF-I 濃度の間には、弱い負の相関 (-0.41) が見られ、牛の成長においてストレスが負の影響を与えることが示唆された。また、アペリン濃度と IGF-I 濃度の間には強い正の相関 (0.83) が見られ、セロトニン濃度と IGF-I 濃度の間には弱い負の相関 (-0.36) が見られた。この結果から、アペリンが筋肉の成長を促進し、セロトニンは成長を抑制する可能性が示唆され、これらのホルモンが生産性の指標となり得る可能性が示された。

マウス由来筋芽細胞 (C2C12) の分化誘導刺激におけるストレス応答ホルモン刺激の影響

筋芽細胞の分化刺激におけるストレス応答ホルモン刺激試験の結果を表に示す。分散分析および Tukey の多重比較検定を用いて、遺伝子別に各ホルモン刺激区の影響を解析した結果、対照区と比較してセロトニン刺激区の MyHC II x mRNA 発現が有意に低くなった。また、MyHC II a および MyHC II b mRNA 発現には有意な差が見られなかったが、MyHC I mRNA 発現を見ると、アペリン刺激区の値がオキシトシン刺激区よりも有意に低い値となった (いずれも $P < 0.05$)。これらの結果から、セロトニンが II 型筋線維への分化を、アペリンが I 型筋線維への分化をそれぞれ抑制する可能性が示唆された。今後はミオシン重鎖タンパク質の発現解析を行い、実際に分化した筋線維型をさらに詳しく解析することで、これらの作用について検討を続ける必要がある。

表 3 C2C12 細胞の分化誘導時における、ストレス応答ホルモン刺激の影響

	MyHC I	MyHC II a	MyHC II x	MyHC II b
対照区	100±20 ^{ab}	100±18	100±16 ^a	100±7
アペリン区	73±5 ^b	114±22	84±12 ^{ab}	123±9
オキシトシン区	149±11 ^a	97±11	90±16 ^{ab}	130±12
セロトニン区	110±19 ^{ab}	49±12	44±6 ^b	133±38

リアルタイムPCRを用いて、MyHC I, II a, II b および II x mRNA 発現量を測定し、18s rRNA を内部標準として標準化した。表中の値は平均値±標準誤差を示し、異なるアルファベットは刺激区間に有意差 ($P < 0.05$) があることを示す。

表 2 FC で飼育している肉用牛の血液中ホルモン濃度相関 ($n = 15$)

	オキシトシン	セロトニン	コルチゾール	IGF-I
アペリン	0.05	-0.14	-0.28	0.83
オキシトシン		0.04	0.14	-0.06
セロトニン			0.12	-0.36
コルチゾール				-0.41

謝辞

本研究は、秋田県立大学平成 28 年度学長プロジェクト「創造的研究」および「平成 28 年度公益財団法人伊藤記念財団助成」の支援を受けて行った。

文献

- Elabd C, Cousin W, Pavan U, Chen RY, Choolijian MS, Ju Li, Kung S, Jiang KP, Conboy IM. (2014). Oxytocin is an age-specific circulating hormone that is necessary for muscle maintenance and regeneration. *Nature communications* 2014; 5: 4082
- Lam DD, Garfield AS, Marston OJ, Shaw J, Heisler LK. (2010). Brain serotonin system in the coordination of food intake and body weight. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* vol.97 1; 84-91
- Lee E. Uhm KO, Lee YM, Kwon J, Park SH, Soo KH. (2008). Oxytocin stimulates glucose uptake in skeletal muscle cells through the calcium-CaMKK-AMPK pathway. *Regulatory Peptides* vol.151 1-3; 71-74
- Sato K, Takahashi T, Kobayashi K, Hagino A, Roh SG, Katoh K. (2012). Apelin is involved in postprandial responses and stimulates secretion of arginine-vasopressin, adrenocorticotrophic hormone and growth hormone in the ruminant. *Domestic Animal Endocrinology* 42(3):165-72.
- Takayanagi Y, Yoshida M, Bielsky IF, Rosss HE, Kawamata M, Onaka T, Yanagisawa T, Kimura T, Matzuk MM, Young LJ, Nishimori K. (2005). Pervasive social deficits, but normal parturition, in oxytocin receptor-deficient mice. *PNAS* vol. 102 no. 44: 16096-16101

Watanabe H, Nakano T, Saito R, Akasaka D, Saito K,
Ogasawara H, Minashima T, Miyazawa K, Kanaya
T, Takakura I, Inoue N, Ikeda I, Chen Xi, Miyake M,
Kitazawa H, Shirakawa H, Sato K, Tahara K,
Nagasawa Y, Rose MT, Ohwada S, Watanabe K,
Aso H. (2016). Serotonin Improves High Fat Diet
Induced Obesity in Mice. *PLoS One*
14;11(1):e0147143

〔 平成 29 年 6 月 30 日受付
平成 29 年 7 月 11 日受理 〕

The effect of stress hormone on the myoblast proliferation and exchanges the muscle fiber type.

Katsuyoshi Sato, Yusuke Watahiki and Masaki Yokoo

Department of Agribusiness, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University

In recent years, the idea of animal welfare has become widespread in the field of animal husbandry field. It has been determined that stress adversely affects the productivity of animals and the quality of animal product. It is very important to reduce the stress on livestock. We have attentively studied stress related hormones in animal husbandry. The aim of this study was 1) to investigate the correlation coefficients among the stress related hormones (apelin, oxytocin, and serotonin), insulin-like growth factor-I (IGF-I), and cortisol, 2) the effect of these stress-related hormones to myoblast cell growth and differentiation. In Experiment 1, with Japanese short horn cattle, plasma IGF-I concentrations positively correlated with apelin, yet negatively correlated with serotonin. In Experiment 2 with mouse myoblast cell line C2C12 from RIKEN, MyHC 2x mRNA expression levels with serotonin were lower than that of control group, and MyHC 1 (slow type) mRNA expression levels with apelin group were lower than that of with oxytocin group. These results demonstrate that apelin, oxytocin, and serotonin play an important role in muscle growth and the quality of meat.

Keywords: apelin, oxytocin, serotonin, myoblast, C2C12